



Evento	Salão UFRGS 2018: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Estudo dos mecanismos de indução de apoptose em Echinococcus spp. e sua relevância para a identificação de novos alvos para o controle parasitário
Autores	PEDRO QUARTIERO MARMONTEL MARTIN PABLO CANCELA SEHABIAGUE
Orientador	HENRIQUE BUNSELMEYER FERREIRA

RESUMO

TÍTULO DO PROJETO Estudo dos mecanismos de indução de apoptose em *Echinococcus* spp. e sua relevância para a identificação de novos alvos para o controle parasitário

Orientador: Henrique Bulsemeyer Ferreira

Aluno: Pedro Quartiero Marmontel

1. Introdução:

A equinococose (hidatidose) cística é uma doença parasitária causada pela fase larval de parasitos cestódeos pertencentes ao complexo *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) (Alvarez Rojas, Romig & Lightowers, 2014) com aspecto crônico, frequentemente causa morbidade e mortalidade nos seres humanos. Esta doença é endêmica no Cone Sul, com 200.000 novos casos diagnosticados por ano (WHO, 2012).

A doença é causada pela forma larval do parasito (metacestódeo ou cisto hidático) e seu ciclo de vida necessita de dois hospedeiros (Hemphill et al. 2009), um canídeo, como hospedeiro definitivo, e um ungulado doméstico (tipicamente um ovino ou um bovino) ou um primata, incluindo o homem, como hospedeiro intermediário.

Na região rural, é comum o reaproveitamento das vísceras do animal abatido, usado como alimento de animais domésticos. Com isto, os protoescolícos (PEs, formas pré-adultas), presentes no cisto hidático das vísceras do animal, são consumidos e se diferenciam em verme adulto no intestino do cão. Uma vez no intestino, o verme deposita ovos que são liberados com as fezes, podendo haver a ingestão acidental destes ovos pelos seres humanos. Uma vez no corpo, os ovos eclodem no trato digestivo, liberando uma oncosfera que penetra no epitélio intestinal, seguindo principalmente para o fígado e pulmões. Nestes órgãos se desenvolve o cisto hidático, e o ciclo se completa.

A doença pode permanecer assintomática durante décadas (Eckert & Deplazes, 2004) e, quando os sintomas aparecem, o tratamento de escolha geralmente é o cirúrgico (Garcia, Morod & Schantzid, 2007) sendo necessário o estudo de novos fármacos para o controle e tratamento da hidatidose. Com o sequenciamento do genoma de três espécies do complexo *E. granulosus* s.l.: *Echinococcus granulosus* s.s. (genótipos G1), *Echinococcus ortleppi* (genótipo G5) e *Echinococcus canadensis* (genótipo G7) (Tsai et al. 2013, Zheng et al. 2013 e Maldonado et al., 2016), foram propostos possíveis alvos farmacológicos (Tsai et al., 2013), como cistatinas, quinases e enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, como a enzima ribonucleotídeo-redutase (RNR). Contudo, estudos experimentais de validação destas enzimas como alvos terapêuticos ainda não foram realizados. Este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos de potenciais drogas sobre *Echinococcus* spp. e a atividade da RNR.

A RNR de *Echinococcus* spp. possui duas subunidades, uma maior (RNR1, 92,5 kDa) e uma menor (RNR2, 38,5 kDa). Em *Echinococcus* spp., assim como em outros organismos, a RNR é essencial para a síntese de nucleotídeos. Sabe-se já que a hidróxi-ureia (HU) age como um inibidor da RNR, reduzindo a subunidade RNR2 e tornando a enzima não funcional. Outro possível inibidor da RNR é o COH29, que se liga à subunidade RNR1, impedindo-a de se ligar a RNR2 para formação do tetrâmero (RNR1)₂(RNR2)₂.

O projeto tem como objetivo elucidar a seletividade e o mecanismo de ação destes inibidores, através de ensaios enzimáticos e técnicas de biologia molecular. Os estudos que estão sendo realizados pretendem averiguar os mecanismos de ação destas drogas sobre *Echinococcus* spp. Com isso, espera-se contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos e estratégias terapêuticas para equinococoses, e outras parasitoses.

2. Atividades realizadas pelo bolsista:

a) Coleta e processamento de cistos hidáticos e PEs de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*. Foram coletados e processados cistos hidáticos de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, provenientes de frigorífico na região metropolitana de Porto Alegre. Dos cistos, foram obtidas amostras de PEs. Após a coleta, os PEs foram lavados com PBS e corados com Azul de Tripán, a viabilidade foi avaliada por microscopia óptica. Os PEs viáveis foram armazenados a 4 °C até a sua utilização. Para determinação dos genótipos e espécies, foi feita amplificação por PCR do gene da enzima citocromo-c-oxidase 1 (COX1) e clivagem com a enzima de restrição *AluI*.

b) Ensaios *in vitro* utilizando os inibidores da RNR em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*. Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a suscetibilidade dos PEs das duas espécies a concentrações crescentes dos inibidores HU e COH29. Em cada ensaio, foram usados aproximadamente 500 PEs em 500 µL de meio RPMI com o inibidor HU nas concentrações 5 mM, 10 mM e 50 mM por 24 h. O mesmo tipo de ensaio foi feito com o inibidor COH29, nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM. Posteriormente ao tratamento, a morfologia e a viabilidade dos PEs foram avaliadas.

c) Análises proteômicas de protoescólices incubados com o inibidor da RNR Hidróxi-uréia. Após tratamento com HU (50 mM) extratos proteicos de protoescólices foram preparados para análise proteômica. As amostras obtidas serão posteriormente analisadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS), para identificação e quantificação de proteínas.

d) Expressão e purificação da subunidade RNR2 da RNR de *E. granulosus* s.s. A partir de clone plasmidial recombinante previamente construído pelo nosso grupo de pesquisa, foi realizada a expressão da subunidade menor (RNR2) em fusão com glutathione-S-transferase (GST) na linhagem de *Escherichia coli* BL21 pLysE. A proteína recombinante (EgRNR2-GST) foi purificada em coluna de afinidade Glutathione Sepharose 4B e a porção correspondente à GST foi removida por clivagem com a protease TEV. A quantidade e a pureza da EgRNR2 recombinante produzida foi avaliada por SDS-PAGE 12%.

3. Objetivos atingidos:

- a) Genotipagem de PEs coletados de 10 cistos hidáticos para determinação das espécies *Echinococcus* s.s. de *E. ortleppi*.
- b) Determinação da viabilidade dos PEs coletados para seleção de amostras com viabilidade superior a 90%.
- c) Avaliação dos efeitos de concentrações crescentes dos inibidores da RNR, HU e COH29 sobre a morfologia e a viabilidade dos PEs.
- d) Preparação de extratos proteicos de PEs tratados ou não com os inibidores HU e COH29, para posterior análise proteômica.
- e) Expressão da subunidade RNR2 recombinante de *E. granulosus* (Eg-RNR2) em *E. coli*.
- f) Purificação da proteína recombinante EgRNR2.

Também foi adquirida experiência em técnicas de biologia molecular, como a eletroforese e purificação de proteínas por cromatografia de afinidade assim como estudada as bases teóricas do projeto de pesquisa e atividades previamente realizadas pelo grupo.

4. Resultados obtidos:

- a) Foi observada a redução da viabilidade dos PEs na presença dos dois inibidores da RNR (HU e COH29) de *E. granulosus* (s.s), em meio RPMI com a presença de HU na concentração de 50mM e no meio com 1mM de COH29, após 24 h.
- b) Foram preparados extratos de PEs controle (não tratados) e tratados com 50 mM de HU para posterior identificação e quantificação de proteínas por LC-MS/MS.
- c) Foram otimizadas as condições (temperatura, tempo de indução e concentração de indutor) para a otimização da expressão da EgRNR2 recombinante em *E. coli* BL21 pLysE.d) A EgRNR2 foi purificada com alto rendimento (10 mg/L de cultura).

5. Conclusão:

As atividades realizadas no primeiro período tiveram papel importante para o treinamento e aquisição de proficiência nas principais técnicas envolvidas no projeto de desenvolvimento tecnológico. Foi adquirida experiência em técnicas de biologia molecular, como a eletroforese e purificação de proteínas por cromatografia de afinidade, e em técnicas de coleta e cultivo de protozoários de *E. granulosus*.

Como atividades do segundo período, serão realizadas análises por LC-MS MS das amostras de extratos de PEs tratados ou não com HU e COH29, para identificação e quantificação de proteínas. A análise comparativa dos resultados de LC-MS/MS deverá fornecer subsídios para a elucidação dos mecanismos de ação da HU e do COH29 sobre PEs de *E. granulosus*.

Serão ainda otimizadas as condições de expressão da EgRNR1 em *E. coli* e purificação da proteína recombinante. Juntamente a EgRNR2 recombinante, já purificada, será reconstituída *in vitro* a RNR recombinante na sua configuração tetramérica funcional (RNR1)₂(RNR2)₂, possibilitando a realização de ensaios enzimáticos *in vitro*. Com isso, poderá ser verificada *in vitro* a possível ação da HU, da COH29 e de outras potenciais drogas inibidoras sobre a RNR de *E. granulosus*.

Elucidado o mecanismo de ação destas drogas inibidoras, temos como perspectiva a elaboração de vacinas eficientes para equinococose cística e outras helmintíases. Além de ter grandes benefícios para a indústria pecuária, diminuindo consideravelmente os gastos econômicos anuais com o tratamento do rebanho, estes novos fármacos propostos têm potencial de aumentar a eficiência do tratamento da doença, que geralmente depende de cirurgias bastante invasivas.

BIBLIOGRAFIA

- Garcia, H. H., Morod, P. L., Schantz, M. P. (2007). Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 20:489–494.
- Hemphill, A., Stadelmann, B., Scholl, S., Muller, J., Spiliotis, M., Muller, N., Gottstein, B. & Siles-Lucas, M. (2009). *Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes*. *Parasitology*: 1-19.
- Eckert, J. & Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 107–135.
- 5-Zhou, B., Su, L., Hu, S., Hu, W., Yip, M. L. R., Wu, J., Yen, Y. (2013). A small-molecule blocking ribonucleotide reductase holoenzyme formation inhibits cancer cell growth and overcomes drug resistance. *Cancer Research*, 73(21), 1094-1099.
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M. K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D. P., Chen, Z., Zhou, Y., Wang, S. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 45:10: 1168-1175.
- Maldonado, L., Assis, J., Araujo M. F., Salim C. A., Machiarolli, N., Cucher, N., Camicia, F., Fox, A., Rosenzvit, M., Oliveira, G., Kamenetzky, L. (2016). The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: a key knowledge of parasitic plathyhelminth human diseases. IMPaM, CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. *BMC Genomics* 18:204.
- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW (2014) *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans—review of current knowledge. *Int J Parasitol* 44: 9–18.
- WHO (2012). World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases – A roadmap for implementation, available from http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf.